

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-276966

⑬ Int. Cl.

G 01 N 33/483  
33/493  
33/68

幾別記号

A  
A

庁内整理番号

7055-2G  
7055-2G  
7055-2G

⑭ 公開 平成2年(1990)11月13日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全3頁)

⑮ 発明の名称 水晶振動子たん白質センサ

⑯ 特 願 平1-98436

⑰ 出 願 平1(1989)4月13日

⑱ 発 明 者 松 本 元

神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌオーケー株式会社内

⑲ 発 明 者 後 藤 正 男

神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌオーケー株式会社内

⑳ 出 願 人 エヌオーケー株式会社

東京都港区芝大門1丁目12番15号

㉑ 代 理 人 弁理士 吉田 俊夫

PTO 99-4271

S.T.I.C. Translations Branch

明 細 書

1 発明の名称

水晶振動子たん白質センサ

2 特許請求の範囲

1. 水晶振動子表面にたん白質結合性色素固定化膜を形成せしめてなる水晶振動子たん白質センサ。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、水晶振動子たん白質センサに関する。更に詳しくは、水晶振動子を用い、たん白質の検出量の簡易化を達成せしめるたん白質センサに関する。

(従来の技術)および(発明が解決しようとする課題)

たん白質の定量には、従来のビュレット法、Lovry法、蛍光法、色素結合法、波長230nmでの吸収を測定する方法などが用いられている。しかしながら、これらの方法は、測定時間が比較的長かったり、生化学実験手法上高度の熟練性を要

したり、あるいは高価な分光光度計を用いなければならないなどの問題点を有している。

本発明の目的は、こうした問題点を避け、たん白質の検出量の簡易化を達成せしめる水晶振動子たん白質センサを提供することにある。

(課題を解決するための手段)

かかる目的を達成せしめる本発明の水晶振動子たん白質センサは、水晶振動子表面にたん白質結合性色素固定化膜を形成せしめてなる。

水晶振動子表面へのたん白質結合性色素固定化膜の形成は、水晶振動子の表面にγ-アミノプロピルトリエトキシシランの約1~10%水溶液を塗布し、約45~80℃で約1~30分間加熱して乾燥させた後、約0.1~5%グルタルアルデヒド水溶液中に約1~24時間浸漬し、更に約1~5%色素染色液溶液中に約1~24時間浸漬することによって行われる。この色素としては、例えばクマシー・ブリリアントブルー-G250、ボンソー3R、ニグロシン、アミドブラック10B、キシレンブリリアントシアニング、ナフタレンブルーブラックなどの合成あるいは天

BEST AVAILABLE COPY

然性のたん白質結合性色素が用いられる。

水晶振動子としては、ATカット、振動周波数 5MHz 以上のものが好んで用いられ、その使用態様の一例が第 1 図に平面図として示されており、例えば表面積が約 0.64cm<sup>2</sup> の水晶面 21 の真中に振電極 22 が取付けられ、水晶面および振電極のそれぞれからリード線 23、23' が引き出されている。

#### (作用) および (発明の効果)

水晶振動子は、下記式に示されるように、表面に付着した物質の重量変化に対応して、その周波数に変化する。このような原理に基づいてたん白質量を感度よく測定することができる。

$$\Delta F = K \cdot \Delta m$$

$\Delta F$ : 周波数変化量

$\Delta m$ : 付着重量変化量

$K$ : 定数

本発明に係る水晶振動子たん白質センサは、水晶振動子の表面にたん白質結合性色素固定化膜を形成させただけであるのでコスト的に低廉であり、しかもそれを用いた測定操作も簡易である。

た。得られた結果は、第 1 図のグラフに示され、この結果からたん白質溶液の濃度と周波数の変化量との間には相関関係のあることが分かる。

#### 比較例

牛血清アルブミン溶液の代わりに、同濃度でしよ糖を蒸留水に溶かした水溶液について同様の測定を行ったが、そこには周波数の変化が認められなかった。

#### 実施例 2

上記センサを用い、健康尿とたん白質含有尿とを比較した結果、健康尿についてはその含有たん白質量が 5mg/dl であったのに対し、腎炎患者の尿含有たん白質量は 30mg/dl であり、そこに明らかな差が認められ、このセンサが尿たん白検出器としても有効に使用し得ることが確認された。

#### 4 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明で用いられる水晶振動子の一例態様の平面図である。第 2 図は、本発明に係る水晶振動子たん白質センサの周波数測定回路の一例である。また、第 3 図は、実施例 1 におけるたん

この水晶振動子たん白質センサによって測定されるたん白質としては、牛血清アルブミン、牛ガンマーグロブリンなどの生体由来たん白質成分などが挙げられる。

#### (実施例)

次に、実施例について本発明を説明する。

#### 実施例 1

第 1 図に示される形状の水晶振動子 (八雲通信工業製、AT カット、振動周波数 10MHz) の表面に、 $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランの 5% 水溶液を塗布し、60℃ で 10 日間加熱乾燥させた後、1% グルタルアルデヒド水溶液中に 12 時間浸漬し、その後 4℃ 恒温下でクマシールブリリアントブル-G250 色素の 2% 染色液 (メタノール 45ml、氷酢酸 5ml、水 50ml) 溶液中に 12 時間浸漬し、色素の固定化を行った。

このようにして作製された水晶振動子たん白質センサの振動子面を、濃度 12.5、25、50 または 100 mg/ml の牛血清アルブミンの水溶液に接触させ、その周波数を振動周波数測定装置を用いて測定し

白質濃度と周波数変化との関係を示すグラフである。

#### (符号の説明)

21.....水晶面

22.....振電極

24.....水晶振動子

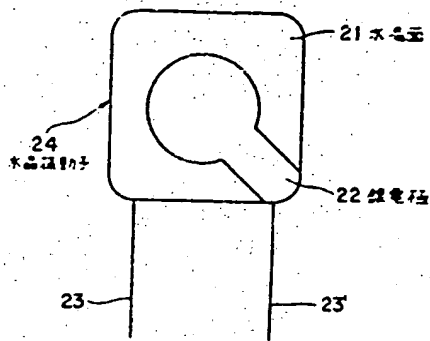
25.....水晶振動子たん白質センサ

26.....周波数カウンター

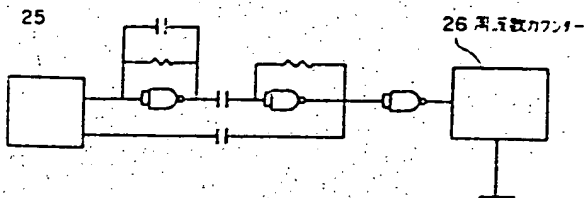
#### 代理人

弁理士 吉田俊夫

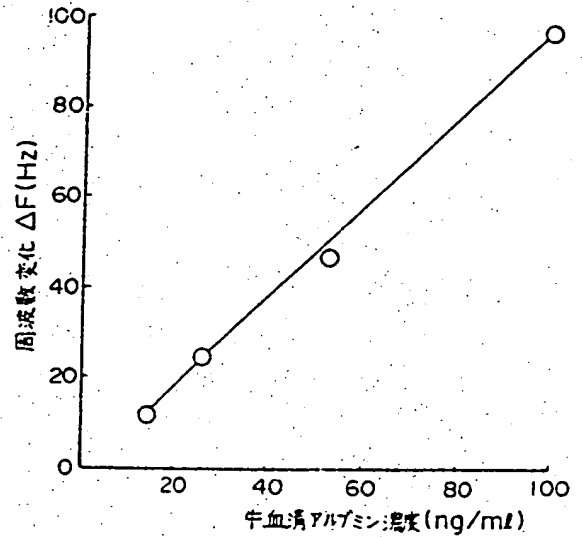
第1図



第2図



第3図



手続補正書 (自発)

平成1年9月22日

特許庁長官 吉田 文毅 殿

1 事件の表示

平成1年特許願第98436号

2 発明の名称 水晶振動子たん白質センサ

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 (436) エスオーケー株式会社

4 代理人 (〒150)

住所 東京都渋谷区恵比寿南1丁目21番11号

ビルサイド恵比寿202号

氏名 (6600) 井理士 吉田 俊夫

電話 (03)760-7881番

5 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

6 補正の内容

(1)第3頁第6行の「水晶面および」を「裏面側にも取付けられた」に訂正する。

(2)第5頁第1行の「第1図」を「第3図」に訂正する。

添付書 (図)

Patent: JP402276966A

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-276966

⑤ Int. Cl.<sup>9</sup>G 01 N 33/483  
33/493  
33/68

識別記号

A 7055-2G  
A 7055-2G  
7055-2G

庁内整理番号

④ 公開 平成2年(1990)11月13日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全3頁)

⑭ 発明の名称 水晶振動子たん白質センサ

⑰ 特 願 平1-98436

⑱ 出 願 平1(1989)4月18日

⑲ 発 明 者 松 本 元 神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌオーケー株式会社内

⑲ 発 明 者 後 藤 正 男 神奈川県藤沢市辻堂新町4-3-1 エヌオーケー株式会社内

⑲ 出 願 人 エヌオーケー株式会社 東京都港区芝大門1丁目12番15号

⑲ 代 理 人 弁理士 吉田 俊夫

## 明 細 書

## 1 発明の名称

水晶振動子たん白質センサ

## 2 特許請求の範囲

1. 水晶振動子表面にたん白質結合性色素固定化膜を形成せしめてなる水晶振動子たん白質センサ。

## 3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、水晶振動子たん白質センサに関する。更に詳しくは、水晶振動子を用い、たん白質の検出定量の簡易化を達成せしめるたん白質センサに関する。

(従来技術)および(発明が解決しようとする課題)

たん白質の定量には、従来ビュレット法、Lovry法、蛍光法、色素結合法、波長280nmでの吸収を測定する方法などが用いられている。しかしながら、これらの方法は、測定時間が比較的長かったり、生化学実験手法上高度の熟練性を要

したり、あるいは高価な分光光度計を用いなければならないなどの問題点を有している。

本発明の目的は、こうした問題点を避け、たん白質の検出定量の簡易化を達成せしめる水晶振動子たん白質センサを提供することにある。

(課題を解決するための手段)

かかる目的を達成せしめる本発明の水晶振動子たん白質センサは、水晶振動子表面にたん白質結合性色素固定化膜を形成せしめてなる。

水晶振動子表面へのたん白質結合性色素固定化膜の形成は、水晶振動子の表面にγ-アミノプロピルトリエトキシシランの約1~10%水溶液を塗布し、約45~80℃で約1~30分間加熱して乾燥させた後、約0.1~5%グルタルアルデヒド水溶液中に約1~24時間浸漬し、更に約1~5%色素染色液溶液中に約1~24時間浸漬することによって行われる。この色素としては、例えばクマシン・ブリリアントブルー-G250、ボンソー-3R、ニグロシン、アミドブラック10B、キシレンブリリアントシアニング、ナフタレンブルーブラックなどの合成あるいは天

ECCX17411111

Ponleatx

Patent: JP402276966A

## 特開平2-276966 (2)

然性のたん白質結合性色素が用いられる。

水晶振動子としては、ATカット、振動周波数5MHz以上のものが好んで用いられ、その使用態様の一例が第1図に平面図として示されており、例えば表面積が約0.64cm<sup>2</sup>の水晶面21の真中に銀電極22が取付けられ、水晶面および銀電極のそれぞれからリード線23,23'が引き出されている。

## 〔作用〕および〔発明の効果〕

水晶振動子は、下記式に示されるように、表面に付着した物質の重量変化に対応して、その周波数が増減するので、このような原理に基づいてたん白質量を感度よく測定することができる。

$$\Delta F = K \cdot \Delta m$$

$\Delta F$ : 周波数変化量

$\Delta m$ : 付着重量変化量

K: 定数

本発明に係る水晶振動子たん白質センサは、水晶振動子の表面にたん白質結合性色素固定化膜を形成させただけであるのでコスト的に廉価であり、しかもそれを用いた測定操作も簡易である。

た。得られた結果は、第1図のグラフに示され、この結果からたん白質溶液の濃度と周波数の変化量との間には相関関係のあることが分かる。

## 比較例

牛血清アルブミン溶液の代わりに、同濃度でしよ糖を蒸留水に溶かした水溶液について同様の測定を行ったが、そこには周波数の変化が認められなかった。

## 実施例2

上記センサを用い、健康尿とたん白質含有尿とを比較した結果、健康尿についてはその含有たん白質量が5mg/dlであったのに対し、腎炎患者の尿含有たん白質量は30mg/dlであり、そこに明らかな差が認められ、このセンサが尿たん白検出器としても有効に使用し得ることが確認された。

## 4 図面の簡単な説明

第1図は、本発明で用いられる水晶振動子の一例の平面図である。第2図は、本発明に係る水晶振動子たん白質センサの周波数測定回路の一例である。また、第3図は、実施例1におけるたん

この水晶振動子たん白質センサによって測定されるたん白質としては、牛血清アルブミン、牛ガンマーグロブリンなどの生体由来たん白質成分などが挙げられる。

## 〔実施例〕

次に、実施例について本発明を説明する。

## 実施例1

第1図に示される形状の水晶振動子(八雲通信工業製、ATカット、振動周波数10MHz)の表面に、 $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランの5%水溶液を塗布し、60℃で10分間加熱乾燥させた後、1%グルタルアルデヒド水溶液中に12時間浸漬し、その後4℃恒温下でクマシニ・ブリリアントブルー-G250色素の2%染色液(メタノール45ml、氷酢酸5ml、水50ml)溶液中に12時間浸漬し、色素の固定化を行った。

このようにして作製された水晶振動子たん白質センサの振動子面を、濃度12.5、25、50または100ng/mlの牛血清アルブミンの水溶液に接触させ、その周波数を振動周波数測定装置を用いて測定し

白質濃度と周波数変化との関係を示すグラフである。

## (符号の説明)

21.....水晶面

22.....銀電極

24.....水晶振動子

25.....水晶振動子たん白質センサ

26.....周波数カウンター

代理人

弁理士 吉田 俊夫

**PTO: 99-4271**

**Japanese Published Unexamined (Tokkyo Kokai Koho) Patent Application (A) No. 02-276966, published November 13, 1990; Application No. 01-98436, filed April 18, 1989; Int. Cl.: G 01 N 33/483, 33/493, 33/68; Inventor(s): Motoru matsumoto et al.; Assignee: N O K Corporation; Japanese Title: Protein-Sensing Crystal Vibrators**

---

## **Protein-Sensing Crystal Vibrators**

### **CLAIM(S)**

**A protein-sensing crystal vibrator made by forming a protein-bondable pigment stabilizing film on the surface of a crystal vibrator.**

### **DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION**

#### **(Field of Industrial Application)**

**The present invention pertains to a protein-sensing crystal vibrator. More specifically, it pertains to a protein sensor for simplifying the process of detecting and quantifying the protein by using a crystal oscillator.**

#### **(Prior Art and the Problems to Be Addressed)**

**For quantifying protein, a bullet method, a Lovry method, a fluorescent method, a pigment bonding method, and a method to measure the adsorption at wavelength 280 nm have been used. These methods, however, require a relatively long time for measuring, and a highly trained skill in biochemical technique is required, or an expensive spectrometer needs to be used for measuring, which is a**

**problem.**

**The objective of the present invention, considering the aforementioned problems, presents a protein-sensing crystal vibrator that can easily detect and quantify protein.**

**(Means to Solve the Problems)**

**The protein-sensing crystal vibrator of the present invention that achieves the aforementioned objective is made by forming a protein-bondable pigment stabilizing film on the crystal oscillator.**

**The protein-bondable pigment stabilizing film on the crystal oscillator surface can be formed by coating a solution containing nearly 1 - 10%  $\gamma$  - amino propyl triethoxysilane onto the surface of the crystal oscillator, heating it at nearly 45-80°C for 1 - 30 minutes for drying, and by immersing it in a solution containing nearly 0.1-5% glutaraldehyde for nearly 1-24 hours. As for the pigment, a synthetic or natural protein-bondable pigment of Coomassie brilliant blue G250, Ponceaux 3R, nigrosine, amid black 10B, xylene brilliant cyanide G, or of naphthalene blue black can be used.**

**As for the crystal oscillator, the one having an A-cut and vibration frequency 5 MHZ or higher is preferred. One example of its application is shown by its top view in Fig. 1. For example, in the center of crystal surface 21 having the surface dimension nearly 0.64 cm<sup>2</sup>, silver electrode 22 is mounted, and lead wires 23 and 23'**

are led out from the crystal surface and silver electrode, respectively.

#### **(Operation and Advantage of the Invention)**

As shown by the equations below, the frequency of the crystal vibrator changes in response to the weight changes of the substance attached to the rear surface, so protein can be measured with high sensitivity, based on the following factors:

$\Delta F$ : frequency change level

$\Delta M$ : attached substance weight change rate

K: constant

The protein sensing crystal vibrator of the present invention can be made only by forming the protein-bondable stabilizing film on the surface of the crystal vibrator, it can be made at low cost, and the measuring operation using it is easy.

The proteins that can be measured by this protein sensing crystal vibrator are proteins derived from biological bodies, such as cow serum albumin and cow gamma-globulin.

#### **(Embodiment)**

##### **Example 1**

The embodiment example is explained below.

On the surface of a crystal vibrator having a shape shown in Fig. 1 (manufactured by Yae Communications Engineering. A-cut, vibration frequency 10



MHZ), a solution containing  $\gamma$ -amino propyl triethoxysilane nearly 5% is coated and dried by heating at 60°C for 10 minutes. Subsequently, it is immersed in the glutaraldehyde 1% solution for 12 hours and further immersed in a Coomassie brilliant blue G250 pigment 25% dye solution (composed of methanol 45 ml, glacial acetic acid 5ml, and of water 50 ml) for 12 hours to stabilize the pigment.

The vibrator surface of the protein-sensing crystal vibrator thus manufactured is brought into contact with the cow serum albumin solution with concentration 12.5, 25, 50, or 100 ng/ml, and the frequency is measured by using a vibration frequency measuring device. The result is shown in the graph of Fig. 3, from which it is evident that there is a relationship between the protein solution concentration and the frequency changes.

#### **Comparative example**

The same measuring operation was conducted by using a solution made by mixing saccharose in distilled water at same concentration, but the frequency change was not observed.

#### **Example 2**

By using the same sensor, urine from a healthy person and urine containing protein was compared. As a result, the urine from a healthy person indicated 5 mg/dl of protein, whereas the protein contained in nephropathy patient was 30 mg/dl, and there was a noticeable difference between the two. Therefore, it was

recognized that the sensor of the present invention effectively useful for detecting urine protein.

## **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

Fig. 1 shows a top view of the crystal vibrator as one example of the present invention. Fig. 2 shows one example of the frequency measuring circuit of the protein-sensing crystal vibrator of the present invention. Fig. 3 shows a graph illustrating the relationship between the protein concentration and the frequency changes.

21. Crystal surface

22. Silver electrode

24. Crystal vibrator

25. Protein-sensing crystal vibrator

26. Frequency counter

Translations  
U.S. Patent and Trademark Office  
July 16, 1999  
Akiko smith

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**